

EFICACIA DEL INOCULO MICELIAR DE 17 ESPECIES DE HONGOS ECTOMICORRICICOS PARA LA MICORRIZACION CONTROLADA DE: *PINUS PINASTER*, *PINUS RADIATA* Y *PSEUDOTSUGA MENZIESII*, EN CONTENEDOR

J. PERA

I.F. ALVAREZ

J. PARLADE

Dpto. de Patología Vegetal. IRTA

Centre de Cabrils. Ctra. de Cabrils, s/n. 08348 Cabrils, Barcelona. ESPAÑA

RESUMEN

La micorrización controlada de las plantas en el vivero puede facilitar los procesos de revegetación y reforestación. No obstante, la utilización de los hongos ectomicorrícicos a escala comercial no será posible si no se dispone de métodos prácticos y eficaces para la producción y aplicación de inóculo.

En el presente trabajo se han abordado experimentos de micorrización controlada, mediante la incorporación de micelio de distintas cepas fúngicas, para la producción en contenedor de tres coníferas de importancia forestal en España: *Pinus pinaster*, *Pinus radiata* y *Pseudotsuga menziesii*; con el objetivo de determinar el método de inoculación más adecuado en condiciones de vivero y establecer la dosis de inóculo óptima.

De los 20 aislados fúngicos probados, los mejores resultados se obtuvieron con los aislados pertenecientes a las especies *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria bicolor* y *Laccaria laccata*, tanto en forma de inóculo miceliar producido en turba-vermiculita como en forma de micelio incluido en polímeros de alginato. Para los aislados del género *Hebeloma* se obtenían mejores resultados aplicando un inóculo miceliar producido en turba-vermiculita, mientras que para los aislados del género *Laccaria* se mejoraban los resultados al aplicar micelio incluido en alginato. La dosis óptima de aplicación de inóculo variaba para cada combinación hongo-planta, aunque en la mayoría de los casos se podían obtener niveles cercanos al 50 p. 100 de raíces cortas micorrizadas aplicando concentraciones de inóculo comprendidas entre 1:32 y 1:64 (inóculo : sustrato, v:v). En algunos casos, como en las inoculaciones realizadas con micelio de *L. laccata* incluido en alginato, la dosis de aplicación se podía reducir hasta 1:80 ó 1:160.

PALABRAS CLAVE: Micorrización de coníferas en contenedor

Pino pinaster

Pino insignis

Abeto de Douglas

Hebeloma crustuliniforme

Laccaria bicolor

Laccaria laccata

Recibido: 13-5-98

Aceptado para su publicación: 3-8-98

INTRODUCCION

La micorrización controlada en vivero y su efecto en los procesos de reforestación, en distintos países y condiciones ecológicas, han sido ampliamente estudiados y revisados (Castellano, Molina, 1989; Marx, Ruehle, 1989; Kropp, Langlois, 1990; Castellano, 1996) y actualmente no existe ninguna duda de que los hongos ectomicorrícicos son un componente esencial en los ecosistemas forestales (Vogt *et al.*, 1991). La utilización de planta micorrizada no sólo ha facilitado la revegetación en condiciones particulares, como pueden ser la recuperación de suelos degradados o escombreras de minas y la introducción de especies exóticas en distintas partes del mundo, sino que también ha mejorado la repoblación en suelos forestales (Castellano, 1996).

El efecto sobre el desarrollo de la planta varía según la especie fúngica asociada y las condiciones ambientales. Por tanto, la selección del hongo ectomicorrícico para la inoculación de las plantas en el vivero es uno de los aspectos más importantes de la aplicación de esta tecnología en la producción forestal (Trappe, 1977; Kropp, Langlois, 1990; Garbaye, 1991), y se obtendrá un mayor o menor éxito en la medida en que dispongamos de un rango de hongos seleccionados capaces de mejorar la supervivencia y el crecimiento de las plantas en distintas condiciones ambientales. No obstante, la utilización de estos hongos será imposible si no se dispone de métodos prácticos y eficaces para la producción y aplicación de inóculo.

El crecimiento miceliar del hongo en un soporte sólido (turba-vermiculita) suplementado con solución nutritiva, y su incorporación al sustrato o suelo del vivero, ha sido uno de los métodos más utilizados para la producción y aplicación de inóculos ectomicorrícicos (Marx, Kenney, 1982; Harvey, 1991). Esta técnica de producción de inóculo ha sido adoptada universalmente y se ha utilizado con éxito, incluso a escala comercial, para la inoculación de distintas especies forestales (Marx *et al.*, 1982, 1984; Hung, Molina, 1986; Hung, Trappe, 1987).

Algunas técnicas desarrolladas en otros campos de la microbiología se han adaptado también a la producción de inóculo ectomicorrícico. La inclusión del micelio fúngico en geles de polímeros inertes, como el alginato sódico (Le Tacon *et al.*, 1983, 1985; Mauperin *et al.*, 1987; Kuek *et al.*, 1992), ha dado mejores resultados que el inóculo producido en turba-vermiculita para especies fúngicas como *Laccaria bicolor* (Mortier *et al.*, 1988).

Los experimentos de micorrización controlada, abordados en el presente trabajo, perseguían dos objetivos, determinar el método de inoculación más adecuado en condiciones de vivero mediante la incorporación de micelio de distintas cepas fúngicas, y establecer la dosis de inóculo óptima para cada técnica de inoculación y cada una de las especies fúngicas seleccionadas, para la producción en contenedor de tres coníferas de importancia forestal en España: *Pinus pinaster* Ait., *Pinus radiata* D. Don y *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco.

MATERIAL Y METODOS

Condiciones de crecimiento para la producción de planta en contenedor

En todos los experimentos se utilizaron semillas seleccionadas de las especies forestales: *Pinus pinaster* (origen Aquitania, CEMAGREF, CNRF, Francia, nº de lote 81245),

Pinus radiata (origen País Vasco, Oihanberri S.A.) y *Pseudotsuga menziesii* (origen 261, Oregón, EE.UU., n° de lote 313-1980). Las semillas se lavaron durante 12 horas en agua corriente en circulación y se desinfectaron por inmersión en H_2O_2 al 33 p. 100 durante 30 min en agitación (Barnett, 1976). Una vez desinfectadas, se lavaron con un volumen suficiente de agua destilada estéril (previamente esterilizada a 120° C durante 20 min) y se distribuyeron en placas Petri que se sellaron con Parafilm®. Estas semillas se estratificaron a 4 ° C durante 30-40 días.

Todas las plantas se cultivaron en contenedores Sherwood de 175 cm³ de capacidad (Rootainers®, Spencer-Lemaire Ind.; Edmonton, Alberta, Canadá). Antes de su utilización, los contenedores se desinfectaron por inmersión en lejía al 20 p. 100.

El sustrato estaba constituido por turba de Sphagnum (Floratorf®) tamizada (2 mm de tamaño de partícula) y vermiculita (Termita®, Asfaltex S.A.) grado 2 (2 mm de tamaño de partícula), mezcladas en una proporción 1:1 (v:v) (Owston, 1972; Barnett, 1974; Tinus, 1974), con un pH final de 5,5. Todo el sustrato utilizado en los distintos experimentos se esterilizó en el autoclave (120° C, 60 min).

Las plantas se regaron por aspersión (3 min) tres veces por semana, aumentando a una frecuencia diaria durante los meses de verano. Se fertilizaron cada tres semanas dispensando 10 ml por planta de una disolución en agua de: 2,15 g/l de Kristalon® (NPK: 17-6-18) (Shell), 0,24 g/l de Hortrilon® (BASF) y 0,18 g/l de Fetrilon® (BASF), acidificada a pH 5,5 con una disolución al 10 p. 100 de HNO_3 . En cada fertilización, el aporte de nutrientes (mg/planta) fue: 3,65 N, 0,56 P, 3,20 K, 0,35 Fe, 0,07 Mg, 0,06 Cu, 0,06 Mn, 0,01 B, 0,01 Mo y 0,01 Zn.

En todos los experimentos, las plantas se cultivaron en un invernadero de cristal climatizado y sombreado con una malla blanca del 40 p. 100. El control de temperatura se estableció en un máximo de 25-27° C y un mínimo de 18-20° C, mantenido por un sistema de refrigeración en circuito cerrado y un sistema de calefacción por conducción de agua caliente. La humedad relativa se mantuvo siempre por encima del 40 p. 100 mediante un sistema automático de pulverización de agua (Defensor®) alimentado por un destilador (Kottermann® 1032). La intensidad lumínica, a nivel de la banqueta del invernadero y a plena radiación solar, osciló entre 700 y 800 $\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ (400-700 nm) y se aseguró un fotoperíodo de 16 h/día mediante lámparas de sodio de alta presión, que proporcionaban una intensidad lumínica mínima de 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ (400-700 nm) a nivel de la masa foliar de las plantas.

Preparación de los inóculos fúngicos

Inoculaciones con micelio producido en sustrato de turba-vermiculita

La producción de inóculo miceliar en sustrato de turba-vermiculita se hizo siguiendo la técnica descrita por Marx, Bryan (1975) con algunas modificaciones. Los aislados fúngicos (Tabla 1), cuya capacidad simbiótica había sido determinada previamente mediante síntesis en cultivo puro (Pera, Alvarez, 1995; Parladé *et al.*, 1996), se transfirieron, de la colección de cultivos, a placas Petri con medio de cultivo Melin-Norkrans modificado (MMN) (Marx, 1969) y se incubaron a 25° C durante 30 días. A partir de las colonias obtenidas, se transfirieron 15 discos de micelio de 5 mm de diámetro a frascos con tapón de rosca que contenían 70 ml de medio líquido MMN estéril (120° C, 15 min). Los cultivos

líquidos se incubaron a 25° C durante 15-40 días (según la rapidez de crecimiento del hongo) y se agitaron cada cinco-siete días para fragmentar el micelio y conseguir un crecimiento disperso y uniforme.

TABLA 1
HONGOS ECTOMICORRICICOS PROBADOS
EN FORMA DE INOCULO MICELIAR

Ectomycorrhizal fungi tested as mycelial inoculum

Especie fúngica	N.º de cultivo	Características de la zona de recolección			
		Especie vegetal potencialmente asociada	Localidad	Altitud (m)	pH del suelo
<i>Amanita aspera</i> (Fr.) Hooker	48	<i>Quercus robur</i>	Asturias	320	3,7
<i>Amanita muscaria</i> (Schff.) S.F. Gray	17	<i>Castanea sativa</i>	Pontevedra	40	5,2
<i>Amanita rubescens</i> (Pers. ex Fr.) S.F. Gray	73	<i>Castanea sativa</i>	Asturias	340	4,1
<i>Hebeloma crustuliniforme</i> (Bull ex St. Adams) Quel.	126	<i>Picea abies</i>	Barcelona	30	8,3
»	S66*	—	—	—	—
<i>Laccaria bicolor</i> (R. Mre.) Orton	S238*	—	—	—	—
<i>Laccaria laccata</i> (Scop. ex Fr.) Berk. & Br.	127	<i>Quercus ilex</i>	Girona	1000	4,9
<i>Lyophyllum decastes</i> (Fr.) Sing.	71	<i>Pinus radiata</i>	Asturias	240	4,2
<i>Paxillus involutus</i> (Batsch. ex Fr.) Fr.	87	<i>Castanea sativa</i>	Pontevedra	—	4,7
<i>Rhizopogon luteolus</i> Fr. & Nordh.	5	<i>Pinus pinaster</i>	Pontevedra	—	—
<i>Rhizopogon roseolus</i> (Corda ex Sturm) Fr.	96	<i>Pinus sylvestris</i>	Tarragona	1000	7,2
<i>Rhizopogon subareolatus</i> Smith	116	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Girona	1200	5,5
<i>Rhizopogon vulgaris</i> (Vitt.) M. Lange	56	<i>Pinus radiata</i>	Asturias	100	5,1
»	101	<i>Pinus pinaster</i>	Pontevedra	—	4,7
<i>Scleroderma citrinum</i> Pers.	37	<i>Castanea sativa</i>	Asturias	—	—
<i>Suillus bovinus</i> (L. ex Fr.) Kuntze	21	<i>Pinus radiata</i>	Asturias	350	—
»	75	<i>Castanea sativa</i>	Pontevedra	—	—
<i>Suillus granulatus</i> (L. ex Fr.) Kuntze	140	<i>Pinus sylvestris</i>	Barcelona	1400	—
<i>Suillus luteus</i> (L. ex Fr.) S.F. Gray	33	<i>Pinus radiata</i>	Asturias	100	—
<i>Suillus variegatus</i> (Swartz ex Fr.) Kuntze	142	<i>Pinus sylvestris</i>	Barcelona	1400	—

* Características de las cepas detalladas en: Le Tacon *et al.*, 1992

El sustrato para la producción de los inóculos se preparó en frascos de tapón de rosca de 2 l de capacidad. Cada frasco contenía 1100 ml de vermiculita (Termita®) grado 2 (2 mm de tamaño de partícula), 100 ml de turba de Sphagnum (Floratorf®) tamizada (2 mm

de tamaño de partícula) y 600 ml de medio líquido MMN modificado (glucosa 2,5 g/l). Los componentes se mezclaron por agitación y los frascos preparados se autoclavaron a 120° C durante 20 min.

A cada frasco se transfirieron, asépticamente, 140 ml de cultivo líquido del hongo que se quería producir y se incubaron a 25 °C hasta que se consiguió un crecimiento miceliar en todo el sustrato del inóculo (30-60 días). Transcurrido el período de incubación, el inóculo estaba listo para ser usado mediante su incorporación al sustrato de cultivo de las plantas que se querían inocular.

Inoculaciones con micelio incluido en alginato polimerizado

Los aislados ectomicorrícicos se transfirieron del banco de cultivos a placas con medio MMN y se incubaron a 25° C durante 15-30 días. A partir de las colonias obtenidas, se recortaron discos de micelio de 5 mm de diámetro que se transfirieron a erlenmeyers de 300 ml de capacidad con 100 ml de medio líquido MMN (glucosa 5 g/l) estéril, a razón de cinco discos de micelio por erlenmeyer y 12 erlenmeyers por especie fúngica. Los cultivos líquidos se incubaron a 25° C durante 20-30 días.

Transcurrido el período de incubación, se recogió el micelio producido mediante filtración a través de gasa esterilizada (120° C, 15 min) y se lavó con agua destilada estéril para eliminar los restos del medio de cultivo. En condiciones asépticas, se separaron 23 g (peso fresco) de micelio para cada una de las especies fúngicas, se resuspendieron en 100 ml de agua destilada estéril y se trituraron en una batidora Waring® durante 25 s.

Se preparó una solución estéril (120° C, 20 min) de alginato de sodio (SOBALG FD 100,174) al 2 p. 100 en agua destilada y, una vez atemperada, se añadieron 40 g de turba de Sphagnum (0,25 mm de tamaño de partícula) esterilizada por litro de solución de alginato. A la solución resultante se añadieron 10 g/l (peso fresco) de micelio triturado del hongo ectomicorrícico. La suspensión se mantuvo en agitación y se dispensó gota a gota sobre una disolución 0,3 M de CaCl₂ estéril. Las gotas polimerizadas se recogieron, se lavaron con agua destilada estéril y se conservaron a 4° C hasta su utilización.

Diseño experimental y Análisis estadístico

Los inóculos de cada una de las cepas fúngicas se mezclaron con el sustrato de cultivo de las plantas, estableciendo dosis de inoculación crecientes que oscilaban entre 1:64 y 1:4 (inóculo:sustrato, v:v) para el micelio producido en sustrato de turba-vermiculita y entre 1:160 y 1:8 (inóculo:sustrato, v:v) para el micelio incluido en polímeros de alginato. Con el sustrato inoculado se llenaron entre 32 y 64 contenedores para cada dosis de inoculación, estableciendo al mismo tiempo controles no inoculados. En cada uno de los contenedores se sembraron tres semillas, desinfectadas y estratificadas, de una de las especies arbóreas (*Pinus pinaster*, *Pinus radiata* o *Pseudotsuga menziesii*). Una vez germinadas, se dejó una sola planta por contenedor y se distribuyeron totalmente al azar en el invernadero. Las plantas se mantuvieron durante veinte semanas en las condiciones de cultivo anteriormente especificadas.

Transcurrido el período de crecimiento, se recogieron diez plantas al azar para cada especie fúngica y dosis de inoculación y se limpió el sistema radical para liberarlo del sustrato de cultivo. Los porcentajes de micorrización (porcentaje de raíces cortas micorrizadas) se determinaron por recuento directo, a la lupa binocular, de tres muestras, tomadas al azar, del sistema radical de cada planta. En cada muestra se contaron un total de 100 a 200 raíces cortas.

La significación de las diferencias entre tratamientos se determinó por análisis de la varianza y se utilizó el test de Tukey ($p \leq 0,05$) para la comparación de las medias. Los porcentajes de micorrización se normalizaron mediante la transformación angular de los datos ($\arcsen \sqrt{x}$) antes de someterlos al análisis estadístico.

RESULTADOS

Inoculaciones con micelio producido en sustrato de turba-vermiculita

De los 20 aislados fúngicos probados, seis formaron ectomicorrizas con *Pinus pinaster* en las condiciones de cultivo y a las concentraciones de inóculo miceliar aplicadas en el sustrato. La inoculación con el aislado 17 de *Amanita muscaria* producía un porcentaje de micorrización del 11 p. 100 al aplicarlo a la dosis de inoculación más alta (1:4, inóculo:sustrato, v:v), mientras que *Hebeloma crustuliniforme* (126 y S66), *Laccaria bicolor* (S238), *Laccaria laccata* (127) y *Lyophyllum decastes* (71) alcanzaron niveles superiores al 40 p. 100 de raíces cortas infectadas (Tabla 2).

Todas las plantas de *P. pinaster* inoculadas con los dos aislados de *H. crustuliniforme* resultaron micorrizadas a las dosis 1:4 y 1:8. La reducción del inóculo a las dosis 1:16 y 1:32 producía una disminución en el número de plantas micorrizadas y en el porcentaje de raíces infectadas.

La inoculación con *L. bicolor* S238 provocó la infección ectomicorrícica de todas las plantas, independientemente de la dosis de inóculo aplicada. Los niveles de infección radical no presentaban diferencias significativas entre las dosis 1:4 y 1:32, disminuyendo a la mitad a la dosis 1:64 (Tabla 2).

La respuesta de *P. pinaster* a la inoculación con *L. laccata* 127 fue similar a la obtenida con *L. bicolor*. Todas las plantas inoculadas se micorrizaron sin presentar diferencias significativas entre los porcentajes medios de micorrización en las distintas dosis utilizadas (Tabla 2).

La inoculación con el aislado 71 de *L. decastes*, utilizando las dosis comprendidas entre 1:4 y 1:32, produjo un porcentaje comparable de plantas micorrizadas (entre el 85 p. 100 y el 88 p. 100), sin que se presentaran diferencias significativas en los porcentajes medios de raíces infectadas (Tabla 2).

En las plantas de *P. radiata* se obtuvieron buenos resultados de micorrización controlada con tres de los 20 aislados fúngicos probados: *H. crustuliniforme* 126, *L. bicolor* S238 y *L. laccata* 127 (Tabla 3). En ningún caso se detectaron diferencias significativas entre las dosis de aplicación, destacando *H. crustuliniforme* con porcentajes de micorrización más altos.

TABLA 2

MICORRIZACION DE *PINUS PINASTER* EN CONTENEDOR INOCULADO CON DISTINTAS DOSIS DE MICELIO PRODUCIDO EN TURBA-VERMICULITA

Mycorrhizal colonization of containerized Pinus pinaster seedlings inoculated with different dosages of mycelium produced in peat-vermiculite

Dosis de inóculo (1)	Micorrizas (%)				
	<i>Hebeloma crustuliniforme</i> (126) (2)	<i>Hebeloma crustuliniforme</i> (s66)	<i>Laccaria bicolor</i> (S238)	<i>Laccaria laccata</i> (127)	<i>Lyophyllum decastes</i> (71)
0	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
1:64	43 b	- (3)	20 b	—	18 b
1:32	51 bc	14 b	39 c	48 b	31 c
1:16	64 cd	20 b	39 c	58 b	36 c
1:8	80 e	67 c	41 c	52 b	35 c
1:4	74 de	81 c	46 c	58 b	42 c

Dentro de cada columna las medias que comparten una misma letra no presentaban diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $p \leq 0,05$.

(1) Dosis de inóculo expresada como la relación inóculo:substrato, v:v.

(2) Número de cepa o aislado.

(3) No determinado.

TABLA 3

MICORRIZACION DE *PINUS RADIATA* EN CONTENEDOR INOCULADO CON DISTINTAS DOSIS DE MICELIO PRODUCIDO EN TURBA-VERMICULITA

Mycorrhizal colonization of containerized Pinus radiata seedlings inoculated with different dosages of mycelium produced in peat-vermiculite

Dosis de inóculo (1)	Micorrizas (%)		
	<i>Hebeloma crustuliniforme</i> (126) (2)	<i>Laccaria bicolor</i> (S238)	<i>Laccaria laccata</i> (127)
0	0 a	0 a	0 a
1:64	87 b	38 b	46 b
1:32	95 b	47 b	44 b
1:16	93 b	49 b	46 b
1:8	97 b	45 b	33 b
1:4	90 b	40 b	31 b

Dentro de cada columna las medias que comparten una misma letra no presentaban diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $p \leq 0,05$.

(1) Dosis de inóculo expresada como la relación inóculo:substrato, v:v.

(2) Número de cepa o aislado.

Cuatro de los aislados fúngicos utilizados para la micorrización controlada de *P. menziesii* en contenedor resultaron efectivos (Tabla 4). Los aislados *H. crustuliniforme* 126, *L. bicolor* S238 y *L. decastes* 71 se mostraron infectivos a todas las dosis probadas, obteniéndose porcentajes máximos de raíces infectadas del 77 p. 100, 42 p. 100 y 21 p. 100, respectivamente, sin que se detectaran diferencias significativas entre las dosis máxima y mínima probadas. La micorrización con *L. laccata* 127 resultó más variable y dependiente de la dosis de inoculación, obteniéndose porcentajes de infección significativamente más elevados a las dosis 1:4 y 1:8.

TABLA 4

**MICORRIZACIÓN DE *PSEUDOTSUGA MENZIESII* EN CONTENEDOR
INOCULADO CON DISTINTAS DOSIS DE MICELIO PRODUCIDO
EN TURBA-VERMICULITA**

Mycorrhizal colonization of containerized Pseudotsuga menziesii seedlings inoculated with different dosages of mycelium produced in peat-vermiculite

Dosis de inóculo (1)	Micorrizas (%)			
	<i>Hebeloma crustuliniforme</i> (126) (2)	<i>Laccaria bicolor</i> (S238)	<i>Laccaria laccata</i> (127)	<i>Lyophyllum decastes</i> (71)
0	0 a	0 a	0 a	0 a
1:64	— (3)	42 b	19 b	—
1:32	72 b	39 b	30 c	21 b
1:16	75 b	37 b	22 bc	13 b
1:8	77 b	39 b	52 d	16 b
1:4	77 b	32 b	44 d	17 b

Dentro de cada columna las medias que comparten una misma letra no presentaban diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $p \leq 0,05$.

(1) Dosis de inóculo expresada como la relación inóculo:substrato, v:v.

(2) Número de cepa o aislado.

(3) No determinado.

Inoculaciones con micelio incluido en alginato polimerizado

Tres de los 20 aislamientos probados, *H. crustuliniforme* 126, *L. bicolor* S238 y *L. laccata* 127, resultaron efectivos para la micorrización controlada de las tres coníferas (*P. pinaster*, *P. radiata* y *P. menziesii*) (Tabla 5).

En *P. pinaster*, los porcentajes de raíces micorrizadas, con *H. crustuliniforme* 126 disminuyen significativamente al reducir la dosis de 1:40 a 1:160. Mientras que en *P. menziesii*, al reducir la dosis a 1:40 disminuía significativamente la infección radical respecto a la dosis máxima aplicada (Tabla 5).

Con la cepa S238 de *L. bicolor* se obtenían porcentajes de micorrización más elevados al inocular plantas de *P. menziesii* que con cualquiera de las dos especies de *Pinus* estudiadas. Al reducir la aplicación de inóculo a una dosis de 1:80 disminuía significativamente el porcentaje de raíces infectadas respecto de las dosis más altas. Estos porcentajes de infección eran menores en *P. pinaster* y *P. radiata*. Para *P. radiata* no se detectaron diferencias significativas

debidas al incremento de las dosis de inóculo, mientras que para *P. pinaster* la micorrización disminuía significativamente al reducir la dosis de aplicación de inóculo hasta 1:80 (Tabla 5).

En *Pinus pinaster* no se detectaron diferencias significativas entre las distintas dosis de inóculo de *L. laccata* 127 aplicadas. Los porcentajes de raíces cortas micorrizadas fueron algo menores en *P. menziesii*, detectándose una disminución significativa de la infección al reducir la dosis de inóculo de 1:80 a 1:160 (Tabla 5).

TABLA 5

MICORRIZACION DE *PINUS PINASTER*, *PINUS RADIATA* Y *PSEUDOTSUGA MENZIESII* EN CONTENEDOR INOCULADO CON DISTINTAS DOSIS DE MICELIO ENCAPSULADO EN ALGINATO POLIMERIZADO

Mycorrhizal colonization of containerized Pinus pinaster, Pinus radiata and Pseudotsuga menziesii seedlings inoculated with different dosages of mycelium entrapped in alginate beads

Dosis de inóculo (1)	Micorrizas (%)						
	<i>Pinus pinaster</i>		<i>Pinus radiata</i>		<i>Pseudotsuga menziesii</i>		
	<i>Hebeloma crustuliniforme</i> (126) (2)	<i>Laccaria bicolor</i> (S238)	<i>Laccaria laccata</i> (127)	<i>Laccaria bicolor</i> (S238)	<i>Hebeloma crustuliniforme</i> (126)	<i>Laccaria bicolor</i> (S238)	<i>Laccaria laccata</i> (127)
0	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
1/160	33 b	—	45 b	29 b	0 a	—	7 ab
1/80	41 bc	—	46 b	42 cd	0 a	53 b	26 bc
1/64	— (3)	15 a	—	—	—	—	—
1/40	49 c	—	54 b	49 d	17 ab	68 c	35 c
1/32	—	49 b	—	—	—	—	—
1/20	56 c	—	60 b	37 bc	49 bc	67 bc	37 c
1/16	—	54 b	—	—	—	—	—
1/10	53 c	—	48 b	43 cd	62 c	71 c	37 c
1/8	—	66 b	—	—	—	—	—

Dentro de cada columna las medias que comparten una misma letra no presentaban diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $p \leq 0,05$.

(1) Dosis de inóculo expresada como la relación inóculo:substrato, v:v.

(2) Número de cepa o aislado.

(3) No determinado.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Las especies de *Rhizopogon* y *Suillus*, así como los aislados 48 de *Amanita aspera*, 73 de *Amanita rubescens*, 87 de *Paxillus involutus* y 37 de *Scleroderma citrinum*, todas ellas capaces de formar ectomicorrizas con las especies arbóreas hospedadoras en condiciones de síntesis en cultivo puro (Pera, Alvarez, 1995; Parladé *et al.*, 1996a), no logra-

ron infectar las plantas crecidas en contenedor al ser inoculadas en el sustrato utilizando inóculos miceliares producidos en turba-vermiculita o incluidos en polímeros de alginato. La efectividad de la inoculación en condiciones de producción de planta en contenedor no depende únicamente de la capacidad simbiótica del hongo ectomicorrízico seleccionado, sino que también desempeña un papel importante la calidad y la viabilidad del inóculo producido, así como su capacidad para sobrevivir durante el período comprendido entre la inoculación del sustrato y la formación de micorrizas. El inóculo de un hongo micorrízico, aun siendo capaz de formar ectomicorrizas en condiciones axénicas, puede fallar totalmente al ser aplicado en vivero (Molina, 1980; Shaw *et al.*, 1982; Danielson *et al.*, 1984). Se ha sugerido que la escasa o nula efectividad del inóculo miceliar de *Rhizopogon* y *Suillus* podría estar relacionado con una elevada sensibilidad de estos hongos a la manipulación durante la producción y aplicación de este tipo de inóculos, así como a la baja capacidad de estas especies fúngicas para sobrevivir, en forma saprofítica, entre la inoculación del sustrato y la formación de las primeras raíces susceptibles de ser infectadas (Molina, 1980).

Los resultados obtenidos por otros investigadores son contradictorios. La inoculación con distintas especies de *Rhizopogon* y *Suillus*, en forma de inóculo miceliar, ha sido efectiva en *P. radiata* (Theodorou, Bowen, 1970) y *Pinus caribaea* a raíz desnuda (Vozzo, Hacskeylo, 1971), así como en *Quercus* spp. en contenedor (Dixon *et al.*, 1984), pero inefectiva en la inoculación de distintas coníferas en contenedor (Molina, 1980; Garbaye, Bowen, 1987). Recientemente, experimentos de inoculación de *Pinus pinea* en contenedor, realizados bajo las mismas condiciones experimentales que el presente trabajo, han demostrado la posibilidad de obtener plantas micorrizadas con distintos aislados de *Rhizopogon roseolus*, *Scleroderma* sp. y *Suillus bellinii*, utilizando inóculo miceliar producido en turba-vermiculita; aunque aplicado, en todos los casos, a dosis elevadas (1:4, inóculo:sustrato, v:v) (Rincón, 1998). Se ha demostrado que, tanto la capacidad de infección radical, como el efecto que pueda producir sobre la planta, varían entre cepas de una misma especie micorrízica (Marx, 1981; Le Tacon, Bouchard, 1986; Malajczuk *et al.*, 1990), por lo que la obtención de resultados aparentemente contradictorios, en distintos experimentos de inoculación, puede estar explicada por la variabilidad intraespecífica de estos hongos. Por otra parte, la aplicación de suspensiones de basidiosporas de distintas especies del género *Rhizopogon* ha ofrecido buenos resultados para la inoculación de plantas de *P. pinaster* y *P. menziesii* en contenedor (Parladé *et al.*, 1996b). Para estas especies fúngicas, la relativa facilidad de obtención y dosificación de este tipo de inóculo lo hace más aconsejable, desde el punto de vista de su aplicabilidad práctica, necesitando más experimentación antes de que el inóculo miceliar esté suficientemente desarrollado para su transferencia tecnológica con las mismas garantías de efectividad.

La cepa S238 de *L. bicolor* y los aislados de las especies *H. crustuliniforme*, *L. laccata* y *L. decastes*, resultaron infectivos para más de una de las tres especies arbóreas, tanto al inocularlos en forma de micelio crecido en turba-vermiculita como en forma de micelio incluido en polímeros de alginato.

Lyophyllum decastes 71 ofrecía los resultados menos constantes, siendo solo efectivo en forma de inóculo miceliar producido en turba-vermiculita, tanto para *P. pinaster* como para *P. menziesii*, y alcanzando, con esta última especie, porcentajes de infección radical relativamente bajos, incluso a dosis muy elevadas de inoculación.

Hebeloma crustuliniforme producía elevados niveles de infección radical al ser inoculado en forma de micelio producido en turba-vermiculita. En *P. radiata* y *P. menziesii*, se

obtenían alrededor de un 90 p. 100 y un 75 p. 100 de raíces infectadas, respectivamente, incluso a dosis de inoculación comprendidas entre 1:64 y 1:32. La micorrización de *P. pinaster* con esta especie fúngica era más dependiente de la concentración de inóculo aplicada y se necesitaban dosis de 1:8 para conseguir porcentajes elevados de infección radical. La aplicación del mismo hongo en forma de micelio incluido en alginato polimerizado producía niveles de infección más bajos, alrededor del 50 p. 100 para *P. pinaster* y *P. menziesii*, necesitando aumentar la dosis de aplicación a 1:40 ó 1:20 respectivamente.

La cepa S238 de *L. bicolor* micorrizaba las tres coníferas, tanto aplicada en forma de micelio producido en turba-vermiculita como en forma de micelio incluido en alginato. Los porcentajes de raíces infectadas alcanzados mediante la utilización de micelio en turba-vermiculita eran comparables para las tres especies forestales y oscilaban entre un 40 y un 50 p. 100 de raíces micorrizadas. Las dosis de aplicación se podían reducir hasta 1:64 para *P. radiata* y *P. menziesii* y 1:32 para *P. pinaster*. La aplicación del micelio de esta especie fúngica, incluido en alginato, ofreció mejores resultados. Los porcentajes de raíces infectadas aumentaron hasta un 70 p. 100 en *P. menziesii*.

La aplicación de micelio de *L. laccata* producido en turba-vermiculita indujo niveles de infección comparables a los de *L. bicolor*, entre un 40 y un 50 p. 100 de raíces micorrizadas. No obstante, resultó menos efectiva que *L. bicolor* para la micorrización de *P. menziesii*, ya que la dosis de aplicación debía aumentarse a 1:8 para obtener niveles de infección comparables. La utilización de micelio de *L. laccata* incluido en alginato mejoró la efectividad de la inoculación; pudiendo reducir la dosis de aplicación hasta 1:160 para *P. pinaster* y hasta 1:80 para *P. menziesii*, aunque para esta última especie forestal solo se alcanzaron niveles de infección radical próximos al 30 p. 100.

En comparación con el inóculo miceliar en turba-vermiculita, la inclusión de micelio en alginato polimerizado permite una rápida y fácil producción de inóculo, y se han obtenido buenos resultados en la micorrización de plantas a raíz desnuda con especies de los géneros *Laccaria* y *Hebeloma* (Le Tacon *et al.*, 1983, 1985; Mauperin *et al.*, 1987; Mortier *et al.*, 1988). En el presente trabajo también se han obtenido buenos resultados aplicando esta técnica de inoculación, mejorando, en el caso de las especies del género *Laccaria*, la efectividad de la inoculación en comparación con el micelio producido en turba-vermiculita; en el sentido de que se podían obtener niveles de infección comparables aplicando dosis de inóculo inferiores. Probablemente, el aumento de eficacia del inóculo incluido en alginato puede atribuirse a la protección que confiere el polímero frente a procesos de deshidratación del micelio fúngico. No obstante, los experimentos realizados con *Rhizopogon* spp., utilizando el mismo método de producción y aplicación de inóculo incluido en alginato, no dieron resultado a ninguna de las dosis probadas. La falta de efectividad de estas últimas especies fúngicas podría deberse a la sensibilidad del hongo a alguno de los procesos implicados en la producción del inóculo incluido en alginato. Por ejemplo, mientras que *L. bicolor* permanece viable tras períodos de conservación relativamente largos (Mauperin *et al.*, 1987; Parladé, 1992), *Pisolithus tinctorius* pierde totalmente su viabilidad tras seis semanas de conservación a 4° C y la capacidad de crecimiento de algunas especies de *Rhizopogon* se reduce al 43 p. 100 durante el mismo período de conservación (Parladé, 1992). La escasa viabilidad del inóculo, unido a la limitada capacidad de crecimiento saprofítico imputada a *Rhizopogon* spp. (Molina, 1980), explicarían la ineficacia del inóculo incluido en alginato para estas especies fúngicas, ya que el hongo no habría prosperado entre la incorporación del inóculo al sustrato y la formación de las primeras raíces susceptibles de ser infectadas. El desarrollo del inóculo de *Rhizopogon* spp. en algi-

nato requiere aún estudios sobre las modificaciones que se deben introducir durante el proceso de producción con vistas a aumentar su posterior viabilidad.

El efecto de la micorrización controlada sobre el crecimiento de las plantas durante su fase de producción en vivero es muy variable y depende del hongo y la planta implicados, así como del sistema de producción viverística (Castellano, Molina, 1989). En algunos casos, la inoculación con especies como: *H. crustuliniforme*, *L. laccata* y *P. tinctorius* produce un incremento en el crecimiento vegetativo de las plantas del vivero (Theodorou, Bowen, 1970; Dixon *et al.*, 1981; Le Tacon, Bouchard, 1986), en otros casos, con otras combinaciones hongo-planta o con otros sistemas de producción, o no se han detectado efectos o se ha detectado incluso una reducción del crecimiento de las plantas micorrizadas (Bledsoe *et al.*, 1982; Molina, Chamard, 1983; Stenström *et al.*, 1990; Le Tacon *et al.*, 1992). En general, en un sustrato artificial, distinto al suelo natural, y sometido a una fertilización adecuada y regular, la micorrización de las plantas no produce diferencias de crecimiento significativas (Marx, Barnett, 1974; Molina 1979, 1980) ya que la planta puede absorber por las raíces todo lo que necesita sin necesidad del hongo. Además, muchos de los mecanismos por los cuales el hongo influye en el crecimiento de la planta (exploración de un volumen mayor de suelo, movilización de nutrientes, etc.) quedan sin efecto en una producción confinada en contenedor.

En los experimentos de micorrización realizados a lo largo de este trabajo, no se ha detectado una influencia significativa sobre la estimulación del crecimiento de las plantas en contenedor (datos no presentados). En algunos casos, como en las plantas inoculadas con *H. crustuliniforme*, y especialmente a las dosis más altas de inoculación, se ha observado incluso una ligera disminución del crecimiento de las plantas, que podría deberse: al elevado consumo de fotosintatos por parte del hongo (Nylund, Wallander, 1989) o al cambio en las condiciones físicas del sustrato provocado por el aumento en la proporción de vermiculita al utilizar dosis elevadas de inóculo miceliar.

El efecto beneficioso del hongo ectomicorrícico debe manifestarse en campo, una vez las plantas sean llevadas a su lugar definitivo de crecimiento. Los efectos en el vivero pueden permitir la producción de plantas con una calidad fisiológica adecuada para el trasplante, pero incrementar el crecimiento de las plantas en vivero no debe constituir un objetivo en sí mismo. El comportamiento de la simbiosis hongo-planta durante la fase de vivero y después del trasplante a campo puede ser muy diferente, y hongos que no estimulaban el crecimiento de la planta en vivero pueden dar los mejores resultados en campo (Stenström *et al.*, 1985). Así pues, el test definitivo para determinar la efectividad de las cepas ectomicorrícicas lo constituye el establecimiento de plantaciones experimentales para la comparación integrada de resultados a largo plazo. En este sentido, se han establecido varias plantaciones con planta inoculada en la zona norte de España. Los resultados de la experimentación en campo permitirán seleccionar las cepas ectomicorrícicas más eficientes para mejorar la supervivencia y el crecimiento en futuras repoblaciones.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología a través de los proyectos: FOR 89-885 y AGF 92-0979. Nuestro agradecimiento a los Drs. F. Le Tacon (INRA Nancy, Francia) por la cesión de la cepa S238 de *Laccaria bicolor* y C. Walker (Forestry Commission, UK) por la cesión de la cepa S66 de *Hebeloma crustuliniforme*.

SUMMARY

Efficiency of mycelial inoculum of 17 fungal species to promote ectomycorrhizal colonization in containerized *Pinus pinaster*, *Pinus radiata* and *Pseudotsuga menziesii* seedlings

The use of mycorrhizal seedlings would improve the plant performance in revegetation and reforestation. Nevertheless, the use of these ectomycorrhizal fungi, at a commercial scale, will not be possible until practical and efficient methods of inocula production and application are developed.

In the present work, different experiments of controlled mycorrhization have been performed to determine suitable inoculation methods, and dosages of application, for the production of containerized mycorrhizal seedlings of three forest species: *Pinus pinaster*, *Pinus radiata* and *Pseudotsuga menziesii*.

Of the 20 isolates tested, six formed ectomycorrhizas with at least one of the tree species. The best results were obtained with the isolates of: *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria bicolor* and *Laccaria laccata*, using either mycelial inoculum grown in peat-vermiculite or mycelium entrapped in alginate beads. *Hebeloma* isolates performed the best when mycelium grown in peat-vermiculite was used, whereas *Laccaria* isolates were more efficient when applied as mycelium entrapped in alginate. The optimal application dosages varied with each plant and fungus combination, but in most cases levels around 50 p. 100 of mycorrhizal feeder roots were obtained using inocula concentrations ranging from 1:32 to 1:64 (inoculum:substrate, v:v). In specific cases, such as mycelia of *Laccaria laccata* entrapped in alginate beads, the inoculum dosage could be reduced to 1:80 or even 1:160.

KEY WORDS: Inoculation of containerized seedlings

Maritime pine

Monterrey pine

Douglas fir

*Hebeloma crustuliniforme**Laccaria bicolor**Laccaria laccata*

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BARNETT J.P., 1974. Growing containerized southern pines. Proc. North Am. Containerized For. Tree Seedlings Symp. Great Plains Agric. Counc. Publ. n° 68: 124-128.
- BARNETT J.P., 1976. Sterilizing southern pine seeds with hydrogen peroxide. Tree Plant. Notes, 27: 17-19.
- BLEDSE C.S., TENNYSON K., LOPUSHINSKY W., 1982. Survival and growth of outplanted Douglas-fir seedlings inoculated with mycorrhizal fungi. Can. J. For. Res., 12: 720-723.
- CASTELLANO M.A., 1996. Outplanting performance of mycorrhizal inoculated seedlings. In: Mukerji K. G. (ed.). Concepts in Mycorrhizal Research. Kluwer Academic Publ. The Netherlands. pp. 223-301.
- CASTELLANO M.A., MOLINA R., 1989. Mycorrhizae. In: Landis T.D., Tinus R.W., McDonald S. E., Barnett J. P. (eds.). The container tree nursery manual, vol 5, The biological component: nursery pests and mycorrhizae. USDA For. Serv. Agric. Handbk., 674. Washington, DC. pp. 101-167.
- CASTELLANO M.A., TRAPPE J.M., MOLINA R., 1985. Inoculation of container-grown Douglas-fir seedlings with basidiospores of *Rhizopogon vinicolor* and *R. colossus*: effects of fertility and spore application rate. Can. J. For. Res., 15: 10-13.
- DANIELSON R.M., VISSER S., PARKINSON D., 1984. Production of ectomycorrhizae on container-grown jack pine seedlings. Can. J. For. Res., 14: 33-36.
- DIXON R.K., GARRET H.E., COX G.S., MARX D.H., SANDER I.L., 1984. Inoculation of three *Quercus* species with eleven isolates of ectomycorrhizal fungi. I. Inoculation success and seedling growth relationships. Forest Sci., 30: 364-372.
- DIXON R.K., WRIGHT G.M., GARRET E. H., COX G.S., JOHNSON P.J., SANDERS I.L., 1981. Container- and nursery-grown black oak seedlings inoculated with *Pisolithus tinctorius*: growth and ectomycorrhizal development during seedling production period. Can. J. For. Res., 11: 487-491.
- GARBAYE J., 1991. Utilization des mycorhizes en sylviculture. In: Strullu D. G., Perrin R., Planchette C., Garbaye J. (eds.). Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées. Technique et Documentation - Lavoisier, Paris. pp. 197-242.

- GARBAYE J., BOWEN G.D., 1987. Effect of different microflora on the success of ectomycorrhizal inoculation of *Pinus radiata*. *Can. J. For. Res.*, 17: 941-943.
- HARVEY L.M., 1991. Cultivation techniques for the production of ectomycorrhizal fungi. *Biotech. Adv.*, 9: 13-29.
- HUNG L.L., MOLINA R., 1986. Use of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in forestry. III. Effects of commercially produced inoculum on container-grown Douglas-fir and ponderosa pine seedlings. *Can. J. For. Res.*, 16: 802-806.
- HUNG L.L., TRAPPE J.M., 1987. Ectomycorrhizal inoculation of Douglas-fir transplanted container seedlings with commercially produced inoculum. *New Forests*, 1: 141-152.
- KROPP B.R., LANGLOIS C.G., 1990. Ectomycorrhizae in reforestation. *Can. J. For. Res.*, 20: 438-451.
- KUEK C., TOMMERUP I.C., MALAJCZUK N., 1992. Hydrogel bead inocula for the production of ectomycorrhizal eucalypts for plantation. *Mycol. Res.*, 96: 273-277.
- LE TACON F., BOUCHARD D., 1986. Effect of different ectomycorrhizal fungi on growth of Larch, Douglas-fir, Scots pine and Norway spruce seedlings in fumigated nursery soil. *Acta Oecol., Oecol. Appl.*, 7: 389-402.
- LE TACON F., JUNG G., MICHELOT P., MUGNIER M., 1983. Efficacité en pépinière forestière d'un inoculum de champignon ectomycorhizien produit en fermenteur et inclus dans une matrice de polymères. *Ann. Sci. For.*, 40: 165-176.
- LE TACON F., JUNG G., MUNGIER P., MICHELOT P., MAUPERIN C., 1985. Efficiency in a forest nursery of an ectomycorrhizal fungus inoculum produced in a fermentor and entrapped in polymeric gels. *Can. J. Bot.*, 63: 1664-1668.
- LE TACON F., ALVAREZ I.F., BOUCHARD D., HENRION B., JACKSON R.M., LUFF S., PARLADE J., PERA J., STENSTRÖM E., VILLENEUVE N., WALKER C., 1992. Variations in field response of forest trees to nursery ectomycorrhizal inoculation in Europe. In: Read D. J., Lewis D. H., Fitter A. H., Alexander I. J. (eds.). *Mycorrhizas in Ecosystems*. Wallingford : CAB. pp. 119-134.
- MALAJCZUK N., LAPEYRIE F., GARBAYE J., 1990. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* in vitro. I. Mycorrhizal formation in model systems. *New Phytol.*, 114: 627-631.
- MARX D.H., 1969. The influence of ectotrophic fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, 59: 153-163.
- MARX D.H., 1981. Variability in ectomycorrhizal development and growth among isolates of *Pisolithus tinctorius* as affected by source, age, and reisolation. *Can. J. For. Res.*, 11: 168-174.
- MARX D.H., BARNETT J.P., 1974. Mycorrhizae and containerized forest tree seedlings. In: Tinus R. W., Stein W. I., Balmer W.E. (eds.). *Proc. N. Amer. Containerized Forest Tree Seedlings Symp. Great Plains Agric. Council Publ.* N° 68. Denver, CO. pp. 85-91.
- MARX D.H., BRYAN W.C., 1975. Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedlings in fumigated soil infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. *For. Sci.*, 21: 245-254.
- MARX D.H., KENNEY D.S., 1982. Production of ectomycorrhizal inoculum. In: Schenck N. C. (ed.). *Methods and principles of mycorrhizal research*. Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN. pp. 131-146.
- MARX D.H., RUEHLE J.L., 1989. Ectomycorrhizae as biological tools in reclamation and revegetation of waste lands. In: Mahadevan A., Raman N., Natarajan K. (eds.). *Mycorrhizae for Green Asia. Proc. 1st Asian Conf. on Mycorrhizae*. Univ. Madras, Madras, India. pp. 336-344.
- MARX D.H., RUEHLE J.L., KENNEY D.S., CORDELL C.E., RIFFLE J.W., MOLINA R.J., PAWUK W.H., NAVRATIL S., TINUS R.W., GOODWIN O.C., 1982. Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on container-grown tree seedlings. *Forest Sci.*, 28: 373-400.
- MARX D.H., CORDELL C.E., KENNEY D.S., MEXAL J.G., ARTMAN J.D., RIFFLE J.W., MOLINA R.J., 1984. Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on bare-root tree seedlings. *Forest Sci.*, 30, Monograph 25, 101 pp.
- MAUPERIN C., MORTIER F., GARBAYE J., LE TACON F., CARR G., 1987. Viability of an ectomycorrhizal inoculum produced in a liquid medium and entrapped in a calcium alginate gel. *Can. J. Bot.*, 65: 2326-2329.
- MOLINA R., 1979. Ectomycorrhizal inoculation of containerized Douglas-fir and lodgepole seedlings with six isolates of *Pisolithus tinctorius*. *Forest Sci.*, 25: 585-590.
- MOLINA R., 1980. Ectomycorrhizal inoculation of containerized western conifer seedlings. *USDA Forest Service Re. Note*, PNW-357, 12 pp.
- MOLINA R., CHAMARD J., 1983. Use of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in forestry: II. Effects of fertilizer forms and growth of container-grown Douglas-fir and ponderosa pine seedlings. *Can. J. For. Res.*, 13: 89-95.
- MORTIER F., LE TACON F., GARBAYE J., 1988. Effect of inoculum type and inoculation dose on ectomycorrhizal development, root necrosis and growth of Douglas-fir seedlings inoculated with *Laccaria laccata* in a nursery. *Ann. Sci. For.*, 45: 301-310.

- NYLUND J.E., WALLANDER H., 1989. Effects of ectomycorrhiza on host growth and carbon balance in a semihydroponic cultivation system. *New Phytol.*, 112: 389-398.
- OWSTON P.W., 1972. Cultural techniques for growing containerized tree seedlings. In: Anderson H. W., Bryan S. A., Eide R. P. (eds.). *Proc. Western For. Nursery Counc. and Intermt. For. Nursery Assoc.* pp. 34-41.
- PARLADE J., 1992. Técnicas de inoculación de abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) con hongos ectomicorrícicos y su aplicación en reforestación. Tesis Doctoral. Univ. Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona. 202 pp.
- PARLADE J., ALVAREZ I.F., PERA J., 1996a. Ability of native ectomycorrhizal fungi from northern Spain to colonize Douglas-fir and other introduced conifers. *Mycorrhiza*, 6: 51-55.
- PARLADE J., PERA J., ALVAREZ I.F., 1996b. Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 6: 237-245.
- PERA J., ALVAREZ I.F., 1995. Ectomycorrhizal fungi of *Pinus pinaster*. *Mycorrhiza*, 5: 193-200.
- RINCON A., 1998. Identificación y evaluación de hongos para la micorrización controlada de *Pinus pinea* L. producido en contenedor. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. 194 pp.
- SHAW C.G., MOLINA R., WALDEN J., 1982. Development of ectomycorrhizae following inoculation of containerized Sitka and white spruce seedlings. *Can. J. For. Res.*, 12: 191-195.
- STENSTRÖM E., EK M., UNESTAM T., 1985. Prolonged effects of initially introduced mycorrhizae of pine plants after outplanting. In: *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. Proc. 1st Eur. Symp. on Mycorrhizae. Dijon, INRA. (Paris). pp. 503-506.
- STENSTRÖM E., EK M., UNESTAM T., 1990. Variation in field response of *Pinus sylvestris* to nursery inoculation with four different ectomycorrhizal fungi. *Can. J. For. Res.*, 20: 1796-1803.
- THEODOROU C., BOWEN G.D., 1970. Mycorrhizal response of radiata pine in experiments with different fungi. *Aust. For. Sci.*, 34: 183-191.
- TINUS R.W., 1974. Large trees for the Rockies and Plains. *Proc. North. Am. Containerized For. Tree Seedlings Symp.* Great Plains Agric. Counc. Publ. nº 68: 112-118.
- TRAPPE J.M., 1977. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 15: 203-222.
- VOGT K.A., PUBLICOVER D.A., VOGT D.J., 1991. A critique of the role of ectomycorrhizas in forest ecology. *Agric. Ecosystems. Environ.*, 35: 171-190.
- VOZZO J.A., HACSKAYLO E., 1971. Inoculations of *Pinus caribaea* with ectomycorrhizal fungi in Puerto Rico. *Forest Sci.*, 17: 239-245.